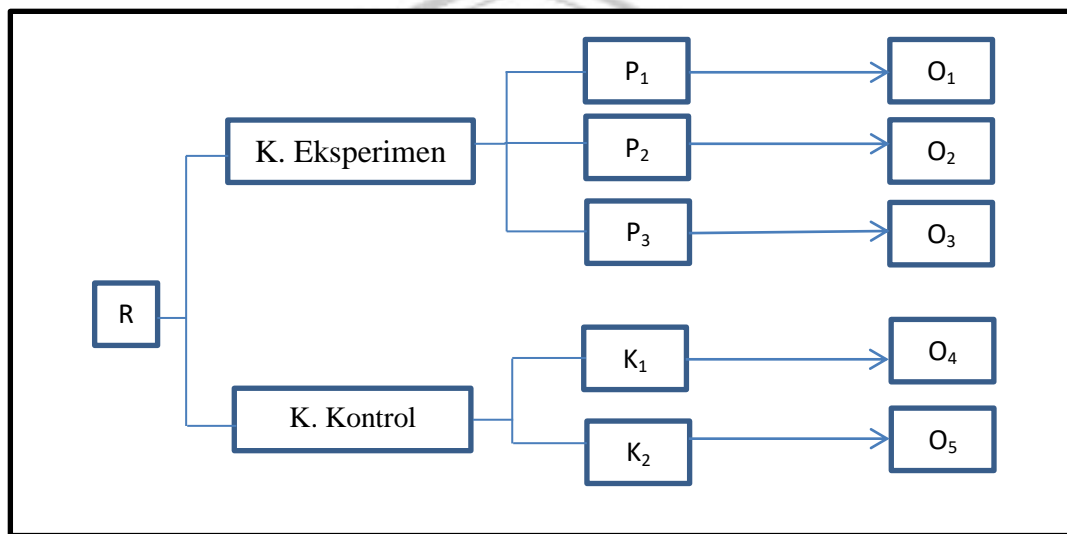


## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 1.1 Pendekatan dan Jenis Penelitian

Peneliti menggunakan pendekatan dengan metode campuran (*mixed methods*) dan jenis penelitian *true eksperimental* dengan menggunakan desain penelitian *post-test only control group design* yang dapat dilihat pada gambar 3.1 :



**Gambar 3.1 Desain post-test only control group**

(Sumber : Ernawati, 2014)

Keterangan :

R = pemilihan responden secara random

P<sub>1</sub> = Perlukaan sayat pada tikus + hidrogel ekstrak kulit nanas (HEKN) hasil formulasi dosis 2,5%

P<sub>2</sub> = Perlukaan sayat pada tikus + hidrogel ekstrak kulit nanas (HEKN) hasil formulasi dosis 4 %

P<sub>3</sub> = Perlukaan sayat pada tikus + hidrogel ekstrak kulit nanas (HEKN) hasil formulasi dosis 10 %

K<sub>1</sub> = kontrol negatif (perlukaan sayat pada tikus + basis gel)

K<sub>2</sub> = kontrol positif (perlukaan sayat ke tikus + NaCL 0,9%)

O<sub>1-5</sub> = nilai post test pada setiap kelompok

## 1.2 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pengetahuan Universitas Muhammadiyah Malang. Dilaksanakan mulai 7 Maret 2020 sampai 15 April 2020.

## 1.3 Populasi, Teknik Sampling, dan Sampel

### 3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semua tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan, dengan kriteria umur 3-3,5 bulan, berat badan 200-250 gram, dan dalam kondisi sehat.

### 3.3.2 Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini adalah *simple random sampling* dimana pemilihan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan dilakukan dengan acak sederhana dan setiap tikus memiliki kesempatan untuk dipilih sebagai sampel.

### 3.3.3 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah 25 tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan, jumlah pengulangan perlakuan dan jumlah sampel dapat diketahui melalui perhitungan menggunakan rumus federer (Wuisan, Hutagalung, & Lino, 2015) sebagai berikut :

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan :

t = perlakuan

n = pengulangan

$$\text{Perhitungan : } (t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4,75$$

(dibulatkan ke atas menjadi 5 kali pengulangan)

Dengan demikian, jumlah pengulangan yang dilakukan adalah sebanyak 5 kali dan jumlah sampel per kelompok adalah sebanyak 5 tikus, sehingga jumlah sampel yang diperlukan adalah sebanyak 25 sampel.

## **1.4 Variabel penelitian**

### **3.4.1 Jenis Variabel**

#### **1. Variabel bebas**

variabel bebas dalam penelitian ini adalah hidrogel ekstrak kulit nanas dalam beberapa konsentrasi yaitu konsentrasi 2,5%, 4%, dan 10%.

#### **2. Variabel terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah luka insisi pada tikus jantan galur wistar yang dilukai sepanjang 2 cm, kemudian panjang penutupan luka diukur menggunakan program *Macbiophotonik Image J*. Sedangkan eritema, edema, dan eskar diamati secara makroskopis.

#### **3. Variabel kontrol**

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah pemberian makanan berupa BR-I sebanyak 20 gr/200grBB dan pemberian minum berupa aquades secara *ad-libitum*, yang diberikan setiap satu kali sehari, serta pembersihan dan penggantian sekam setiap dua hari sekali.

### **3.4.2 Definisi operasional variabel**

1. Hidrogel adalah sediaan topikal dengan komponen *gelling agent*, humektan, dan emulgator sebagai basis hidrogel yang ditambahkan ekstrak kulit nanas dengan konsentrasi 2,5%, 4%, dan 10%, yang terlebih dahulu dianalisis secara organoleptik, homogenitas, dan pH nya sebelum diaplikasikan ke luka insisi tikus.

2. Ekstrak kulit nanas adalah larutan yang dihasilkan dari ekstraksi kulit nanas dan diisolasi dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya, kemudian diuji menggunakan uji Lowry untuk mengetahui total konsentrasi bromelin yang terkandung.

3. Luka insisi adalah luka sayat yang diberikan pada bagian punggung tikus secara sengaja menggunakan pisau bedah dengan panjang luka 2 cm dan kedalaman mencapai lapisan dermis.

### 1.5 Prosedur penelitian

Prosedur penelitian dilakukan melalui tiga tahapan, yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap pengamatan.

#### 1.5.1 Tahap persiapan

Tahap persiapan dilakukan dengan terlebih dahulu menyiapkan alat (Tabel 3.1) dan bahan (Tabel 3.2) yang akan digunakan dalam penelitian, yaitu:

**Tabel 3.1 Peralatan yang dipersiapkan dalam Penelitian**

No	Nama alat	Jumlah
1.	Batang pengaduk	5 buah
2.	Beaker glass 1000 ml	2 buah
3.	Beaker glass 500 ml	1 buah
4.	Beaker glass 250 ml	3 buah
5.	Blender	1 buah
6.	<i>Centrifuge</i>	1 buah
7.	Gelas ukur 100	3 buah
8.	Karet hisap	2 buah
9.	Mortal martil	3 buah
10.	Pipet ukur 5	2 buah
11.	Pipet ukur 10	1 buah
12.	Pipet ukur 25	1 buah
13.	Pipet tetes	2 buah
14.	Timbangan analitik	19 buah
15.	Tabung reaksi	4 buah
16.	Tabung sentrifugasi	4 buah
17.	Rak tabung	1 buah
18.	Kompor listrik	2 buah
19.	spektrofotometer UV VISS	4 buah
20.	Sentrifuge eba 20	3 buah
21.	pH meter	5 buah
22.	Kandang hewan coba	10 buah
23.	Tempat minum hewan coba	9 buah
24.	Sprit injeksi	3 buah
25.	Handscun	1 pak
26.	Jarum sonde	2 buah
27.	Wadah sediaan hidrogel	4 buah
28.	Syringe 1 cc	4 buah
29.	Alat pencukur rambut tikus	3 buah
30.	Penggaris kotak	1 buah
31.	Scalpel	3 buah

Tabel 3.2 Bahan yang Dipersiapkan dalam Penelitian

No	Nama bahan	Jumlah
1.	Hewan coba (tikus putih galur wistar)	25 ekor
2.	Kain saring	1 buah
3.	Kertas label	15 buah
4.	Karbopol 940	0,417 gr
5.	Natrium Carboxy Methyl Cellulose (Na-CMC)	0,15 gr
6.	Gliserol	6,25 ml
7.	<i>propylene glycol</i>	1 ml
8.	Gelatin	0,38
9.	Trietanolamin (TEA)	1,5 ml
10.	Etanol 96%	20 ml
11.	Sekam	14 buah
12.	Alkohol swab	1 pak
13.	Pakan pelet BR I	14 kg
14.	NaCl 0,9%	200 ml
15.	Kulit nanas	710 gr
16.	Ketamin	70 mg
17.	<i>Copper (II) sulfat pentahydrate</i>	0,006 mg
18.	<i>Potassium natrium tartrat-tettrhydrate</i>	0,012 mg
19.	<i>Sodium carbonat</i>	1,22 mg
20.	<i>Sodium hydroxide</i>	0,24 mg
21.	<i>Folin-crocatoces phenol reagens</i>	1,5 mg
22.	Aquades	1 L

Langkah terakhir pada tahap persiapan yaitu memperhitungkan kadar formulasi total sediaan. Formulasi acuan hidrogel yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.3 yaitu :

Tabel 3.3 Formulasi hidrogel

Bahan	Kadar Formulasi		
<b>Ekstrak bromelin</b>	2.5%	4%	10%
<b>Carbopol 940</b>	0.834%	0.834%	0.834%
<b>Na-CMC</b>	0.300%	0.300%	0.300%
<b>Gelatin</b>	0.767%	0.767%	0.767%
<b>Gliserol</b>	12.5%	12.5%	12.5%
<b>Propilen glikol</b>	2%	2%	2%
<b>TEA</b>	3%	3%	3%
<b>Aquades</b>	100%	100%	100%

Sumber : (Edy et al., 2016)

Maka untuk membuat total sediaan hidrogel 50 ml, dengan perkiraan pemakaian 40 ml untuk perlakuan dan 10 ml untuk pengujian sediaan hidrogel. Formulasi yang dipakai sesuai dengan Table 3.4 kadar formulasi sediaan yaitu:

Tabel 3.4 Kadar Formulasi Sediaan

Bahan	Basis Gel	Kadar Formulasi		
		Formulasi Dosis 2,5%	Formulasi Dosis 4%	Formulasi Dosis 10%
Supernatan Kulit Nanas	-	1,25 mL	2 mL	5 mL
Carbopol 940	0,417 g	0,417 g	0,417 g	0,417 g
Na-CMC	0,15 g	0,15 g	0,15 g	0,15 g
Gelatin	0,38 g	0,38 g	0,38 g	0,38 g
Gliserol	6,25 mL	6,25 mL	6,25 mL	6,25 mL
Propilen Glikol	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Tea	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Aquades	50 mL	50 mL	50 mL	50 L

### 3.5.2 Tahap pelaksanaan

#### 1. Persiapan hewan uji

Mempersiapkan hewan uji berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar sebanyak 25 ekor dengan rentang umur 3-3,5 bulan, berat badan 200-250 gram, dan dalam kondisi sehat. Kemudian melakukan penimbangan berat badan tikus dan meletakkan tikus pada kandang-kandang yang telah disiapkan.

#### 2. Aklimatisasi hewan uji

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diaklimatisasi selama 10 hari di dalam laboratorium agar dapat beradaptasi dengan lingkungan dan perlakuan baru. Selama masa adaptasi, dilakukan intervensi dengan pemberian pakan berupa BR-I dan minum berupa aquades secara *ad libitum*, posisi kandang diletakkan pada suhu ruang dengan ventilasi udara yang memadai.

#### 3. Pembuatan ekstrak kulit nanas

Ekstraksi di mulai dengan mencampur kulit nanas sebanyak 710 g ke dalam 710 ml aquades (1:1 b/v) menggunakan blender, larutan kemudian disaring dengan kain muslin untuk menghilangkan bagian seratnya hingga mendapatkan filtrat. Filtrat yang didapatkan disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya, supernatan yang mengandung ekstrak kulit nanas dapat disimpan pada suhu 4°C.

#### 4. Identifikasi bromelin

Identifikasi bromelin dilakukan dengan uji Lowry. Uji Lowry dilakukan melalui beberapa tahap diantaranya yaitu:

- 1) Pembuatan larutan sampel : mengencerkan terlebih dahulu supernatan ekstrak kulit nanas sesuai konsentrasi (2,5%, 4%, dan 10%) masing-masing ke dalam 100 ml aquades. Kemudian memasukkan larutan sampel sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 3 ml aquades dan 5,5 ml reagen Lowry, homogenkan dan diamkan selama 10 menit. tambahkan 0,5 ml folin ciaecalteu : aquades (1:1) dan homogenkan, kemudian di absorpsi pada  $\lambda$  650 nm.
  - 2) Pembuatan larutan blanko : memasukkan 1 ml aquades ke dalam 100 ml aquades di tabung reaksi. Kemudian menambahkan 3 ml aquades dan 5,5 ml reagen Lowry, homogenkan. tambahkan 0,5 ml folin ciaecalteu : aquades (1:1) dan homogenkan, kemudian di absorpsi pada  $\lambda$  650 nm bersamaan dengan larutan sampel. Kadar protein ditentukan regresi liniernya terhadap kurva standar BSA (Harjanto, 2017).
5. Pembuatan hidrogel ekstrak kulit nanas
- a. Campuran I (Pengenceran ekstrak)
    - 1) Melarutkan ekstrak kental bromelin kulit nanas ke dalam bakerglass masing-masing 1,25 ml, 2 ml, dan 5 ml.
    - 2) Mencampurkan etanol 96% ke dalam masing-masing larutan ekstrak dengan perbandingan 2:1.
  - b. Campuran II (basis hidrogel)
    - 1) Mengembangkan setiap basis hidrogel dengan cara memasukkan secara perlahan (karbopol 940 = 0,417 g, Na-CMC=0,15 g, gelatin= 0,38 g) ke dalam mortir yang berisi 20 ml aquades hangat sambil diaduk menggunakan stamper hingga homogen.
    - 2) Setelah homogen dengan terus diaduk menggunakan stamper masukkan 6,25 ml gliserol dan 1 ml propilen glikol secara perlahan hingga homogen.
    - 3) Memasukkan 1,5 ml trietanolamin secara perlahan sambil terus diaduk dan dilakukan pengukuran pH menggunakan pH meter digital.

- 4) Memasukkan hasil pengenceran ekstrak bromelin kulit nanas (campuran I) ke dalam masing-masing basis hidrogel
  - 5) Menambahkan aquadest sebanyak 30 ml secara perlahan seraya terus diaduk.
  - 6) Memasukkan hidrogel ekstrak kulit nanas ke dalam wadah *tube*.
6. Pengujian sediaan hidrogel
- a. Uji organoleptik

Pemeriksaan organoleptik sediaan hidrogel ekstrak kulit nanas dilakukan secara subjektif dengan menilai warna, penampilan (Edy et al., 2016).
  - b. Uji pH

Pengukuran pH hidrogel dilakukan dengan alat pengukur pH meter digital. Pengukuran dilakukan dengan mencelupkan secara sempurna kaca elektroda pH meter ke dalam sediaan hidrogel (I. Setiawan, Lindawati, & Amalia, 2016). Angka yang tertera pada pH meter merupakan nilai pH dari sediaan.
7. Pembuatan luka insisi
- Luka insisi pada tikus dibuat dengan cara penyayatan pada bagian punggung. Pembuatan luka dilakukan dengan terlebih dahulu mencukur rambut di daerah punggung bagian atas hingga bersih. Dilanjutkan dengan mengoleskan alkohol *swab* pada daerah punggung yang akan diberi luka. Selanjutnya membuat sayatan insisi menggunakan scalpel steril dengan panjang luka 2 cm dan kedalaman luka 0,3 cm atau mencapai dermis, ditandai dengan keluarnya darah
8. Pemberian hidrogel ekstrak kulit nanas
- Penanganan luka dilakukan dengan mengoleskan hidrogel ekstrak kulit nanas dengan konsentrasi 2,5%, 4%, dan 10% secara topikal ke area luka.



### 3.5.3 Tahap pengamatan

#### 1. Pengukuran terhadap sediaan hidrogel

Pengukuran terhadap sediaan hidrogel dilakukan melalui pengamatan secara langsung dan pengukuran menggunakan pH meter untuk mengetahui pH dari sediaan.

#### 2. Pengukuran parameter kesembuhan luka insisi

Parameter pengukuran kesembuhan luka dalam penelitian ini merupakan penilaian menggunakan centang terhadap eritema, edema, dan *eskar* sedangkan penutupan panjang luka yang diamati bersamaan dengan kecepatan penyembuhan dilihat dari hari diukur menggunakan penggaris kotak yang kemudian diukur kembali menggunakan *Macbiophotonik Image J* (Andrie & Sihombing, 2017).

Data pengukuran panjang luka yang diperoleh menurut Anwar et al (2018) kemudian diubah menjadi presentase penutupan panjang luka (%) menggunakan rumus berikut;

$$\text{Wound closure (\%)} = \frac{\text{area luka hari ke 0} - \text{area luka hari ke } n}{\text{area luka hari ke 0}} \times 100\%$$

Pengukuran parameter kesembuhan luka insisi pada tikus dapat dilihat pada Tabel 3.5

**Tabel 3.5 Parameter kesembuhan luka insisi pada tikus**

Parameter kesembuhan	Tanda kesembuhan
<b>Eritema (kemerahan)</b>	√ = ada eritema - = tidak ada eritema
<b>Edema (pembengkakan)</b>	√ = ada edema - = tidak ada edema
<b>Eskar (keropeng)</b>	√ = ada <i>eskar</i> - = tidak ada <i>eskar</i>
<b>Penutupan panjang luka</b>	< 50% = belum sembuh > 50% = sembuh total

#### 3. Euthanasia hewan coba

Hewan coba yang telah digunakan selama penelitian akan diberikan perlakuan euthanasia menggunakan kloroform. Euthanasia dilakukan secara inhalasi pada hewan coba dengan dosis 10ml/10 hewan coba pada wadah tertutup dan ditunggu hingga hewan coba pingsan, kemudian

mengeluarkan hewan coba ketika tubuh hewan coba sudah kaku setelah  $\pm 20$  detik.

#### 4. Penguburan hewan coba

Setelah hewan coba dipastikan mati, bangkai hewan coba dikubur di tanah dengan kedalaman minimal 50 cm dan luas lubang  $0,25 \text{ m}^2$ . Setiap lubang hanya digunakan untuk mengubur 10 tikus secara bersamaan, hal ini untuk mencegah bangkai hewan coba digali oleh hewan lain. Lubang ditutup kembali dengan tanah dan dipadatkan agar aroma dari bangkai tidak merebak keluar.

### 1.6 Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan percobaan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan ( 2 perlakuan kontrol dan 3 perlakuan eksperimen) dan 5 kali pengulangan.

- a. Kelompok 1 ( $P_1$ ) = Perlukaan sayat pada tikus + hidrogel ekstrak kulit nanas (HEKN) hasil formulasi dosis 2,5%
- b. Kelompok 2 ( $P_2$ ) = Perlukaan sayat pada tikus + hidrogel ekstrak kulit nanas (HEKN) hasil formulasi dosis 4%
- c. Kelompok 3 ( $P_3$ ) = Perlukaan sayat pada tikus + hidrogel ekstrak kulit nanas (HEKN) hasil formulasi dosis 10%
- d. Kelompok kontrol negatif ( $K_1$ ) = Perlukaan sayat ke tikus + basis gel)
- e. Kelompok kontrol positif ( $K_2$ ) = Perlukaan sayat pada tikus + NaCL 0,9%)

Setiap kelompok diberikan perlakuan dan pengulangan masing-masing sebanyak 5 kali, berikut ragam unit eksperimen :

$P1 = P1_1, P1_2, P1_3, P1_4, P1_5,$

$P2 = P2_1, P2_2, P2_3, P2_4, P2_5,$

$P3 = P3_1, P3_2, P3_3, P3_4, P3_5,$

$K1 = K1_1, K1_2, K1_3, K1_4, K1_5,$

$K2 = K2_1, K2_2, K2_3, K2_4, K2_5,$

Desain rancangan percobaan acak lengkap (RAL) memiliki sifat homogen pada setiap petak, sehingga penempatan setiap sampel eksperimen dilakukan secara acak. Berikut Tabel 3.6 skema desain RAL :

**Gambar 3.2 skema desain RAL**

---

K <sub>2</sub> <sub>2</sub>	P <sub>1</sub> <sub>1</sub>	P <sub>2</sub> <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> <sub>1</sub>	P <sub>3</sub> <sub>2</sub>
P <sub>1</sub> <sub>3</sub>	K <sub>1</sub> <sub>3</sub>	K <sub>1</sub> <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> <sub>3</sub>	P <sub>1</sub> <sub>5</sub>
P <sub>3</sub> <sub>5</sub>	P <sub>3</sub> <sub>4</sub>	P <sub>1</sub> <sub>4</sub>	K <sub>1</sub> <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> <sub>5</sub>
P <sub>2</sub> <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> <sub>1</sub>	K <sub>2</sub> <sub>4</sub>	P <sub>3</sub> <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>
K <sub>1</sub> <sub>1</sub>	P <sub>2</sub> <sub>5</sub>	P <sub>3</sub> <sub>1</sub>	P <sub>1</sub> <sub>2</sub>	K <sub>1</sub> <sub>2</sub>

---

**Keterangan :**

P<sub>1</sub> : Perlakuan HEKN 2,5%

P<sub>2</sub> : Perlakuan HEKN 4%

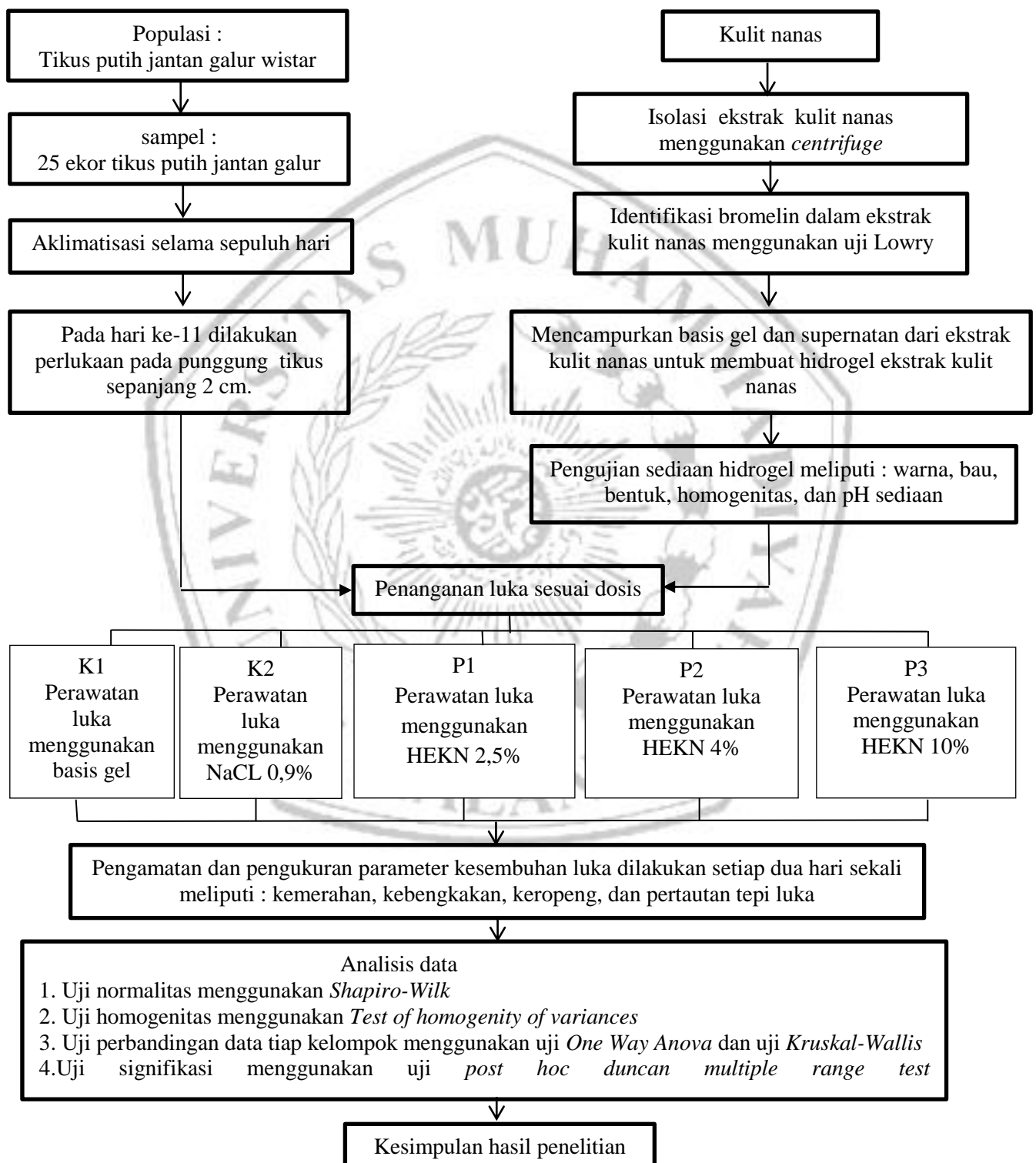
P<sub>3</sub> : Perlakuan HEKN 10%

K<sub>1</sub> : Kontrol negatif

K<sub>2</sub> : Kontrol positif

### 3.7 Kerangka Kerja Penelitian

Berdasarkan ringkasan di atas, maka kerangka kerja penelitian secara ringkas dapat dilihat pada Gambar 3.3 berikut :



Gambar 3.3 Kerangka Kerja Penelitian

### 3.8 Teknik pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan dengan metode observasi, dimana pengumpulan data untuk penyembuhan luka insisi dilakukan dengan pengukuran panjang luka menggunakan *Macbiophotonik Image J*, dan pengamatan secara makroskopis terhadap eritema, edema, dan *scabbing* disekitar area luka selama perlakuan. Pengumpulan data untuk analisis sumber belajar dilakukan dengan melakukan kajian dokumen melalui PERMENDIKBUD RI Nomor 35 Tahun 2018 Tentang Perubahan Peraturan Menteri Pendidikan dan Kebudayaan Nomor 58 Tahun 2014 Tentang Kurikulum 2013 Sekolah Menengah Pertama/Madrasah Tsanawiyah, dan PERMENDIKBUD RI Nomor 37 Tahun 2018 Tentang Perubahan Atas Peraturan Menteri Pendidikan dan Kebudayaan Nomor 24 Tahun 2016 Tentang Kompetensi Inti dan Kompetensi Dasar Pelajaran Pada Kurikulum 2013 Pada Pendidikan Dasar dan Pendidikan Menengah, serta melakukan kajian terhadap proses dan hasil penelitian.

### 3.9 Teknik analisis data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan uji Shapiro-Wilk sebagai uji normalitas, karena besar sampel  $<50$ . Uji normalitas digunakan untuk melihat apakah data berdistribusi normal, sebaran data dinilai normal jika  $p > 0,05$ . Uji homogenitas yang digunakan yaitu uji levene dimana data dikatakan homogen apabila nilai  $p > 0,05$ . kemudian dilakukan uji anova *one way* pada taraf kepercayaan 95% dan apabila hasil analisis ragam minimal berpengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji lanjut *duncan multiple range test*. Uji anova *one way* bertujuan untuk mengetahui perbedaan efektivitas dari masing-masing konsentrasi hidrogel ekstrak bromelin kulit nanas, sedangkan uji lanjut *duncan multiple range test* bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimum dari hidrogel untuk penyembuhan luka.

Apabila data tidak berdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan analisis menggunakan uji statistik nonparametrik dengan uji Kruskal-Wallis. Uji Kruskal-Wallis dilakukan sebagai alternatif dari uji anova *one way*.